

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/22023 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Mai 1999 (06.05.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06863 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98) (30) Prioritätsdaten: 197 47 731.3 29. Oktober 1997 (29.10.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MIRA DIAGNOSTICA GMBH [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEISER, Matthias [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE). EP- PING, Bernd [DE/DE]; Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE). (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING MICRO-ORGANISMS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON MIKROORGANISMEN (57) Abstract <p>A method for identifying micro-organisms belonging to various taxes of micro-organisms, as specified in table 1, in a sample which can contain a plurality of various micro-organisms of said taxes, by means of nucleic acid hybridization techniques using oligo nucleotides with sequence ID. No. 1-62 as probes in order to obtain a hybridization result, whereby at least one hybridization result is obtained for each micro-organism to be identified.</p> (57) Zusammenfassung <p>Verfahren zum Nachweis von in Tabelle 1 angegebenen Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen dieser Taxa enthalten kann, mittels Nucleinsäurehybridisierungstechniken bei Verwendung von Oligonucleotiden mit der Seq. ID. No 1 bis 62 als Sonden, unter Erhalt eines Hybridisierungsergebnisses, wobei für jeden nachzuweisenden Mikroorganismus mindestens ein Hybridisierungsergebnis erhalten wird.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen enthalten kann.

Die Identifikation von Mikroorganismen aus komplexen Proben (die mehrere unterschiedliche Keime im Gemisch enthalten) ist eine wichtige und schwierige Aufgabe, zum Beispiel bei Hygieneuntersuchungen und anderen Vorhaben.

Die WO-A-97/41253 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von einem Mikroorganismus oder mehreren Mikroorganismen in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen enthält, mittels molekularbiologischer Techniken, wie Amplifikationsreaktionen, wobei mindestens eine Hybridisierungs-sonde (A), die konservierte Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuzeigen in der Lage ist und mindestens eine Hybridisierungs-sonde (B), die weniger konservierte Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus(men) anzuzeigen in der Lage ist, zu der Probe gegeben werden, mit der Maßgabe, daß pro interessierendem Mikroorganismus mindestens eine Hybridisierungs-sonde des Typs (A) und des Typs (B) vorhanden sein muß, sich die Probe in einem hybridisierungsfähigen Zustand befindet und durch ein entstehendes Hybridisierungsmuster eine Identifikation des oder der interessierenden Mikroorganismen erfolgt.

Nachteilig an der geschilderten Methode ist, daß viele Bakterienarten aufgrund zu geringer Sequenzvariationen im Bereich der ribosomalen Gene, speziell der 16S rDNA, häufig Kreuzreaktionen mit den gewählten Oligonucleotid-Sequenzen zeigen und demzufolge nicht voneinander differenziert werden können.

WO-A-96/00298 betrifft ein Verfahren zur simultanen Detektion und Identifikation und Differentiation von Eu-Bakterien unter Verwendung eines Hybridisationassays. Dabei werden im wesentlichen 16S-23S rRNA Spacerbereiche amplifiziert und die erhaltenen Nucleinsäuren mit Sonden spezifischer Art hybridisiert. Der Nachteil dieser Methode beruht darin, daß der 16S-23S-Spacerbereich bei vielen Mikroorganismen kein funktioneller Abschnitt ist und deswegen keinem oder nur einem sehr geringen Selektionsdruck unterliegt. Als Folge lassen sich selbst innerhalb einer Art in den verschiedenen rDNA-Operonen Unterschiede in den Längen und Sequenzen der Spacerbereiche nachweisen, die häufig keinen Bezug zu phylogenetischen Zusammenhängen erkennen lassen (T. Hain: Molekulare Identifizierung von Streptomyzeten über Sequenzanalyse der Spacerbereiche ribosomaler RNA-Operone: Diplomarbeit Naturwiss. Fak. Der TU Carolo Wilhemina Braunschweig, 1995, 63 S.) und deshalb für diagnostische Fragestellungen ungeeignet erscheinen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß die Spacersequenzen bisher nur bei wenigen Arten untersucht sind und es demzufolge für sie im Unterschied zu den 16S rDNA-Sequenzen noch keine ausreichenden Sequenzdatenbanken gibt. Dies bedeutet, daß bislang nicht genügend Sequenzinformationen vorliegen, um Nachweismethoden auf der Basis der Spacerregionen für die wichtigsten Bakterienarten zu entwickeln, selbst wenn der erstgenannte Nachteil beherrschbar wäre.

EP-A-0 497 464 A1 betrifft einen mikrobiologischen Schnellassay durch in situ Hybridisation in wäßriger Lösung. Dabei werden die Mikroorganismen zunächst mit

einer wäßrigen Zusammensetzung in Kontakt gebracht, wodurch die Mikroorganismen zum einen fixiert und zum anderen die Zellwände für Oligonucleotide durchlässig gemacht werden. Danach werden markierte Nucleinsäuresonden zugegeben, die mit bestimmten Nucleotidsequenzen in der zellulären Nucleinsäure komplementär sind, so daß sich eine Hybridisierungsreaktion einstellt, gefolgt von einer Detektion der hybridisierten Nucleinsäure. Dieses Verfahren betrifft eine In-situ-Hybridisierungsmethode. Die Erkenntnisse und Methoden sind auf in-vitro-Analysen, wie sie bei PCR- und Hybridisierungstests in Reaktionsgefäßen mit isolierter Ziel-Nucleinsäure üblich sind, nicht übertragbar. In-situ-Methoden haben den Nachteil, daß Probenvorbereitung und/oder Testdurchführung, insbesondere was den Detektionsteil betrifft, sehr komplizierte und teure Geräte erfordert.

US-A-5,614,361 betrifft ein Verfahren zur Charakterisierung eines unbekannten Organismus in einer Probe durch Bestimmung der Position eines Teils oder der gesamten konservierten DNA des betreffenden Organismus relativ zur Position von Restriktionsendonuclease-Spaltungsstellen in der DNA, wobei sich ein für einen bestimmten Mikroorganismus charakteristisches Muster einstellt. Nachteilig an diesem Verfahren ist, daß die Identifizierung von Organismen anhand ihrer DNA-Spaltmuster nach Abbau durch Restriktionsendonucleasen sehr aufwendig ist und die Reinkultur der zu analysierenden Organismen verlangt.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht mithin darin, zunächst die genannten Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden und darüber hinaus auch dem Anwender ein Verfahren an die Hand zu geben, daß es ihm nach Maßgabe seiner analytischen Probleme erlaubt, ein Assay-Verfahren zusammenzustellen, daß auf die spezifischen Bedürfnisse eines Analysenproblems zugeschnitten ist.

Gelöst wird dieses Problem durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1. Die Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Überraschenderweise gewährleisten die erfindungsgemäßen Oligonucleotide mit den Seq. ID. Nr. 1 - 62 gemäß Sequenzprotokoll eine praxisgerechte Bakterienidentifikation.

Die variablen Regionen ribosomaler Gensequenzen sind häufig benutzt worden, um phylogenetische Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen Arten herzustellen und DNA-Sonden bzw. PCR-Startoligonucleotide für diagnostische oder analytische Zwecke zu entwerfen und zu verwenden.

Allerdings hat sich hierbei mittlerweile in der Fachwelt die Anschauung durchgesetzt, daß die Sequenzen insbesondere der kleinen ribosomalen RNA (16S rDNA von Prokaryonten) wenig geeignet sind, um enger verwandte Bakterienarten geschweige denn -stämme hinreichend voneinander unterscheiden zu können. So schreiben z. B. Barry et al. (The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria, PCR Methods and Applications 1 (1991) 51 - 56), daß zu wenig Sequenzvariationen zwischen den 16S rRNA-Genen von eng verwandten Mikroorganismen beobachtet werden. Cilia et al. (Sequence heterogeneties among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level, Molec. Biol. Evol. 13 (1996) 451 - 461) stellen fest, daß rRNA-Sequenzen der kleinen Untereinheit nicht adäquat geeignet sind, um phylogenetische Beziehungen zwischen eng verwandten Arten, geschweige denn verschiedenen Stämmen innerhalb einer Art zu analysieren. Sie zitieren hierzu weitere Autoren (Ash et al., Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences, Lett. Appl. Microbiol. 13 (1991) 202 - 206; Rössler et al., 1991; Ruimy et al., 1994). Ähnlich äußern sich Berthier und

Ehrlich (Rapid species identification with two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *Fems Microbiol. Letters* 161 (1998) 97 - 106). rRNA-Sonden eng verwandter Arten können aufgrund der hohen Ähnlichkeit der rRNA-Sequenzen nicht verwendet werden. Sie zitieren hierzu weiterhin Fox et al. (How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identify, *Int. J. Bacteriol.* 42 (1992) 166 - 170), Schleifer et al. (Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria, *Int. Dairy J.* 5 (1995) 1081 - 1094) und Curk et al. (*Lactobacillus paraplantarum* sp. Nov., A new species related to *Lactobacillus plantarum*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46 (1996) 595 - 598).

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt auch eine simultane Erfassung und simultanen Nachweis von Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen enthalten kann. Unter dem Begriff "Taxon" werden Familien, Gattungen, Arten und Unterarten von Mikroorganismen verstanden.

Basis für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Anwendung von Nucleinsäurehybridisierungstechniken. Dabei werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die mit DNA oder RNA, die indikativ für Mikroorganismen sind und aus den nachzuweisenden Organismen stammen, in Wechselwirkung treten. Ist die Konzentration an nachzuweisender Nucleinsäure zu gering, können gegebenenfalls Amplifikationstechniken zur Erhöhung der Konzentration eingesetzt werden. Durch Hybridisierung der Sonden mit der DNA oder RNA wird ein Hybridisierungsergebnis erhalten. Erfindungsgemäß ist dabei wesentlich, daß für jeden nachzuweisenden Mikroorganismus zunächst mindestens ein Hybridisierungsergebnis erhalten wird. Dies kann insbesondere durch das in der WO-A-97/41253 beschriebene Verfahren

- 6 -

erfolgen. Auf den Gegenstand der WO-A-97/41253 wird ausdrücklich Bezug genommen.

Als Sonden werden erfindungsgemäß Oligonucleotide eingesetzt, die einer der im Sequenzprotokoll mit den Seq. Id. Nr. 1 - 62 ausgewiesenen Sequenzen besitzt. Dabei kann erfindungsgemäß sowohl das gesamte Ensemble der Oligonucleotide mit den Nr. 1 - 62 eingesetzt werden oder aber der Anwender sucht die zu seinem Nachweisproblem zugehörigen Oligonucleotide mit der Maßgabe der Zuordnung gemäß Tabelle 1 aus. Erfindungswesentlich ist, daß die Tabelle 1 angibt, welche der genannten Oligonucleotidsequenzen indikativ für das betreffende Taxon ist.

Tabelle 1: Experimentelle Untersuchungen artifizierter Gemische

Diagnostische Fragestellung: Familien-, Gattungs-, Gruppenebene	Oligo-nucleotid 1		Oligo-nucleotid 2		Oligo-nucleotid 3		Oligo-nucleotid 4	
Acinetobacter spp. ¹⁾	Ac.an1r	P						
Acinetobacter spp. ²⁾	Ac.xx1r	P						
Aeromonas spp. ³⁾	Ae.calr	P						
Alcaligenes spp. ⁴⁾	Al.xx1r	P	Al.xx2r	P				
Campylobacter spp. ⁵⁾	Ca.je1r	P						
Listeria spp.	Li.mo2r	P	Ba.la gr1r	P				
Enterobakterien ⁶⁾	Gamma1r							
Diagnostische Fragestellung: Artenebene	Oligo-nucleotid 1		Oligo-nucleotid 2		Oligo-nucleotid 3		Oligo-nucleotid 4	
Acinetobacter junii	Ac.calr	P	En.ae1r	P	Br.th2	P		
Aeromonas hydrophilia	Ae.hylr	P	Ae.hy2r	P				
Aeromonas salmonicida	Ae.salr	P	Ed.ta1r	P	En.cl3r	P		
Aeromonas schubertii	Ae.sclr	P	Pr.vu3r	P	Ed.ta1r	P		
Alcaligenes faecalis	Al.fa2r	P						
Bacillus cereus	Ba.ce gr1r	P	Ba.ce gr2r	P	Ba.ce/stp1r	P		
Bacillus subtilis	Ba.su2r	P						
Brochothrix thermosphacta	Br.th3r	P	Br.th2r	P				

- 7 -

Carnobacterium divergens	Ca.di1r	P					
Carnobacterium galinarum	Ca.pi/ga1r	P					
Carnobacterium piscicola	Ca.pi/ga1r	P					
Citrobacter freundii	Ci.fr2r	P	Ci.fr3r	P	Ci.fr5r	P	Sa.ty2r P
Clostridium perfringens	Cl.pe1r	P					
Edwardsiella tarda	Ed.ta1r	P	Gamma1r	P			
Enterobacter aerogenes	En.ae1r	P	Gamma1r	P			
Enterobacter cloacae	En.cl3r	P	Sa.ty2r	P	Gamma1r	P	
Escherichia coli/S. spp.	Es.co2r	P	Es.co3r	P	Gamma1r	P	
Flavobacterium breve	Fl.br2r	P	En.cl3r	P	Fl.br1r	P	
Flavobacterium odoratum	Fl.od1r	P					
Hafnia alvei	Ha.al2r	P					
Klebsiella oxytoca	Kl.ox3r	P	Gamma1	P			
Lactobacillus paracasei	La.pa1r	P	La.pa2r	P			
Microbacterium lacticum	Mi.la2r	P	Mi.xx1r	P			
Moraxella bovis	Mo.bo1r	P	Mo.ca2r	P			
Pediococcus damnosus	Pe.da/pa1r	P					
Plesiomonas shigelloides	Pl.sh1r	P					
Pseudomonas aeruginosa	Ps.ae1r	P					
Ralstonia pickettii	Ra.pi1r	P	Ra.pi2r	P			
Salmonella Typhimurium	Sa.ty2r	P	Sa.xx5r	P			
Serratia marcescens	Se.ma1r	P					
Staphylococcus aureus	St.au2r pre	P	St.au/ha1r	P	Ba.ce/Stp1 r	P	
Streptococcus agalactiae	Str.ag1r	P	Br.th2r	P			
Vibrio vulnificus	Vi.vu1r	P	Vi.vu2r	P			
Yersinia enterocolitica	Ye.en1r	P	Gamma1r	P			

- 1) Acinetobacter anitra (DSM 30008), Acinetobacter baumannii (DSM 30007), Acinetobacter haemolyticus
 - 2) Acinetobacter baumannii (DSM 30007), Acinetobacter baumannii (DSM 1139), Acinetobacter calcoaceticus (DSM 30006), Acinetobacter haemolyticus
 - 3) Aeromonas caviae, Aeromonas enteropelogenes
 - 4) Alcaligenes denitrificans, Alcaligenes faecalis
 - 5) Campylobacter Spezieis
 - 6) Citrobacter freundii, Edwardsiella tarda, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Escherichia coli/S.spp., Hafnia alvei, Klebsiella oxytoca, Plesiomonas shigelloides, Salmonella Typhimurium, Serratia marcescens, Vibrio vulnificus, Yersinia enterocolitica
- P betyder "positiv"

Die Tabelle 2 stellt die Konkordanz zwischen den Oligonucleotiden und deren Bezeichnung gemäß Tabelle 1 her.

Als Starteroligonucleotid wurde 10-30f mit der Sequenz
GAG TTT GAT CCT GGC TCA G verwendet (Seq. Id. Nr. 62).

Tabelle 2

ID-Nr.	Abkürzung	Sequenz 5'-3'
1.	Ac.an1r	CAC TAT CTC TAG GTA TTA ACT AAA GT
2.	Ac.calr	AGG TAT TAA CTT CAG TAG CC
3.	Ac.xx1r	CGA GTA ACG TCC ACT ATC TG
4.	Ae.calr	CCA GCA GAT ATT AGC TAC TG
5.	Ae.hy 1r	TTG ATA CGT ATT AGG CAT CA
6.	Ae.hy 2r	GTT GAT ACG TAT TAG GCA TCA
7.	Ae.salr	TTG ACA CGT ATT AGG CGC
8.	Ae.sclr	TGG CAG GTA TTA ACC ACC A
9.	Al.fa2r	TCT CGT ATT AGG AGA TAC CTT
10.	Al.xx1r	TAC TGG GCA CGT TCC GAT AT
11.	Al.xx2r	ATA TCG GCC GCT CCA ATA GT
12.	Ba.ce gr2r	TAC CGT CAA GGT GCC AGC T
13.	Ba.ce/stp1r	CCA TGC GGT TCA AAA TGT T
14.	Ba.ce gr1r	CCA GCT TAT TCA ACT AGC
15.	Ba.la gr1r	CGG AAA CCC TCC AAC A
16.	Ba.su2r	ACC GCC CTA TTC GAA CGG T
17.	Br.th2r	AGC GCG GGT CCA TCT CAC
18.	Br.th3r	CAT CTT ATG ATG TTC AGC ACA
19.	Ca.di1r	CC ATG CGG TCA CTT GAA AT
20.	Ca.je1r	AG TGT CAT CCT CCA
21.	Ca.je2r	ATT CTT CCC TAA GAA AAG GAG
22.	Ca.je3r	CGT CAG AAT TCT TCC CTA AG
23.	Ca.pi/galr	TCA TGC GAT TCC TGA AAC
24.	Ci.fr2r	GT AAC GTC AAT GGC TGA GGT
25.	Ci.fr3r	TT CTC TGG ATG TCA AGA GT
26.	Ci.fr5r	CC AAG GCA TCT CTG CCA AG
27.	Cl.pe1r	CC TTT GGT TGA ATG ATG
28.	Ed.ta1r	CC CGT ATC TCT ACA GGA
29.	En.ae2r	GAG TAA CGT CAA TCG CCA AG

- 9 -

ID-Nr.	Abkürzung	Sequenz 5'-3'
30.	En.cl3r	AG CCG TTA CCC CAC CTA CT
31.	Es.co2r	GCA AAG GTA TTA ACT TTA CTC
32.	Es.co3r	GTA ACG TCA ATG AGC AAA GG
33.	Fl.br1r	TA CGC ATG CCT ATC CTA CT
34.	Fl.br2r	TG GTA CCT TCA GCT ACT TA
35.	Fl.od1r	CCA TGG AGC ATT AAT CCG AA
36.	Gamma 1	AAG GTC CCC CTC TTT GGT
37.	Ha.al2r	GT AAC GTC AAT CAC TGT GG
38.	Kl.ox3r	GGT AAC GTC AAT GAA TAA GGT
39.	La.pa1r	CAA CAG TTA CTC TGC CGA CCA
40.	La.pa2r	TTA CGC CAT CTT TCA GCC A
41.	Li.mo2 r	CAA GCA GTT ACT CTT AT
42.	Mi.la2r	AT TTC TGG CCC GTT CTC GT
43.	Mi.xx1r	ATT TCT GGC CCG TTC TCG
44.	Mo.bo1r	CTA TCT CTA GCG AAT TCT TGG
45.	Mo.ca2r	GGT AAC GTC AGG GCT TAT G
46.	Pe.da/pa1r	TGG ATA CCG TCA CTG CAT GAG
47.	Pl.sh1r	CCA CTA GGT ATT AAC TAG TGA
48.	Pr.vu3r	AAC CCC TGC TTT GGT CCG TA
49.	Ps.ae1r	CCG TAC TCT AGC TCA GT
50.	Ra.pi1r	GGT ATT AAC CAG AGC CAT
51.	Ra.pi2r	TAG CCG TGC AGT CAC CA
52.	Sa.ty2 r	CTG CGG TTA TTA ACC ACA ACA
53.	Sa.xx5r	ACC AAT CCA TCT CTG GAT TC
54.	Se.ma1r	ATG AGC GTA TTA AGC TCA CCA
55.	St.au/ha1r	GGC TCT ATC TCT AGA GTT G
56.	St.au2r pre	GTG CAC AGT TAC TTA CAC ATA
57.	Str.ag1r	ATT TTC CAC TCC TAC CAA C
58.	Str.ag3r	CCG TTT CCA AAG CGT ACA AT
59.	Vi.vu1r	GCT AAC GTC AAA TGA TAG TGC
60.	Vi.vu2r	GCT AAC GTC AAA TGA TGC CGC
61.	Ye.en1r	AAC AAC GTA TTA AGT TATTGG
62.	10-30f	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G

Vorzugsweise wird erfindungsgemäß eine weitere Hybridisierung mittels mindestens einer Hybridisierungssonde durchgeführt, die von der ersten Hybridisierungssonde unterschiedlich ist, aber auch eine der Seq. ID Nr. 1 - 61 aufweist. Dies führt dann entweder zum Auftreten oder zum Ausbleiben von Kreuzreaktionen. Diese

Information kann dann zur eindeutigen Identifikation der Mikroorganismen oder eines Mikroorganismenensembles in einer Probe herangezogen werden.

Vorteilhaft am erfindungsgemäßen Verfahren ist mithin die Möglichkeit, in eindeutiger Weise bestimmte Mikroorganismen allein oder ein Ensemble von Mikroorganismen simultan zu bestimmen. Die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse kann dann beispielsweise durch eine zweidimensionale Auftragung der Hybridisierungsergebnisse erfolgen. Es ergibt sich dabei ein bestimmtes Hybridisierungsmuster, welches indikativ für ein bestimmtes Mikroorganismenensemble ist. Solche Muster können z.B. in Datenbanken abgelegt werden. Insbesondere bei Reihenuntersuchungen können solche Muster abgefragt werden und zur schnellen und sicheren Identifizierung eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich mithin insbesondere für automatisierbare Untersuchungen.

Vorzugsweise erfolgt eine Detektion der Kreuzreaktion räumlich und/oder zeitlich oder durch verschiedene Markierungen der Sonden.

Vorzugsweise kann die räumliche Anordnung der Hybridisierungsergebnisse auf einem Substrat erfolgen. Als Substrate kommen beliebige, in der Molekularbiologie gebräuchliche Trägersysteme in Betracht, wie beispielsweise Mikrotiterplatten, Blotting-Papiere, Spezialmembranen oder DNA-Chips.

Eine zeitliche Auflösung der Kreuzreaktion bietet sich bei Durchflußverfahren an. Es werden der Probe sequentiell Hybridisierungssonden zugesetzt und deren Wechselwirkung mit in der Probe enthaltener Nucleinsäure untersucht.

Alternativ kann auch bei einer statischen Analyse durch Wahl geeigneter Markierungsreagenzien eine zeitliche Aufnahme der Hybridisierungsergebnisse in Mustern erfolgen. Beispielsweise ist dies möglich durch Verwendung von Farbstoffen

unterschiedlicher spektraler Charakteristika oder von Fluoreszenzmarkern mit kurzer, unterschiedlicher oder zeitversetzter Lebensdauer. Auch die in zeitlicher Abhängigkeit aufgenommenen Hybridisierungsmuster können in Datenbanken abgelegt werden und dann bei Abgleich mit einer aktuellen Probe als Hinweis für den mikrobiologischen Zustand dieser Probe dienen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind mithin auch Oligonucleotide mit denen in Seq. Id. Nr. 1 - 61 wiedergegebenen Sequenzen.

Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können insbesondere in Form von Kits zusammen mit Hilfsmitteln zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens angeboten werden. In vorteilhafter Weise sind dabei die Oligonucleotide auf einem Substrat angeordnet. Die Anordnung kann insbesondere in festen Zuordnungen erfolgen, so daß bei positiver Hybridisierung eine Detektion auf einem Substrat jeweils an einer standardisierten gleichen Stelle erscheint, was eine Automatisierung der Auswertung erleichtert.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Voranreicherung und Extraktion der Mikroorganismen

Zur Voranreicherung werden 100 ml des Probenmaterials mit 300 ml nicht selektivem Flüssigmedium (CASO-Bouillon), versetzt und für 4 - 18 h im Brutschrank bei 28 - 37°C (abhängig von den Zielorganismen) bebrütet. Anschließend erfolgt die Entnahme von 1,5 ml dieser Flüssiganreicherung für die nachfolgende Extraktion der DNA. Diese Lösung wird für 2 min bei 8000 g

- 12 -

zentrifugiert, der entstandene Überstand verworfen und das Sediment (Pellet) in 100 µl Puffer 1 (2 mg/ml Lysozym, 20 µg/ml Lysostaphin, 100 mM Tris/HCl pH 7,2 - 7,4, 2 mM CaCl₂, 4 % Saccharose-Lösung, Proteinase K-Lösung (20 mg/ml H₂O)) resuspendiert. Danach erfolgt die Zugabe von 20 µl RNase A-Lösung (20 mg/ml in Natriumacetatpuffer, pH 5,2) und Vermischung der Suspension auf dem Schüttler. Im Anschluß daran wird das Gemisch für 10 min bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend werden dieser Lösung 100 µl Puffer 2 (10% SDS-Lösung, 1,5 mM EDTA) zugegeben und nochmals für 10 min bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reinigung der DNA erfolgt mittels DNA-Reinigungssäulen (QIAamp von QIAGEN). Hierzu wird die Lösung mit 200 µl Bindungspuffer (AL-Puffer QIAGEN) und 200 µl absolutem Alkohol versetzt und auf dem Schüttler gut durchmischt. Das gesamte Volumen wird anschließend auf eine Reinigungssäule (in einem Leertube fixiert) gegeben und für 1min bei 8000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wird verworfen, die Reinigungssäule in ein neues Leertube gegeben und mit 500 µl Waschpuffer (AW-Puffer von QIAGEN) beschickt. Es folgt eine erneute Zentrifugation für 1min bei 8000 g und Verwerfen des entstandenen Zentrifugates. Danach werden 200 µl H₂O (auf 60°C vorgewärmt) zugegeben und für 1min bei 8000 g zentrifugiert. Die auf diesem Wege eluierte DNA kann nun für die nachfolgende Identifizierung mittels PCR herangezogen werden.

Identifizierung der Mikroorganismen mittels PCR

Zur Durchführung der PCR werden folgende Reaktionskomponenten miteinander vermischt:

- 13 -

10 x PCR-Puffer (0,1 % Tween, 660 mM Tris/HCl pH 8,8, 166 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

5,0 μl

MgCl₂ (25 mM) 5,0 μl

dNTP's (je 2 mM) 5,0 μl

Taq-Polymerase (5 U/ μl) 0,2 μl

DNA-Template (0,2 ng/ μl) 5,0 μl

Primer A (30 pmol) 1,0 μl

Primer B (30 pmol) 1,0 μl

H₂O 27,8 μl

Die Amplifikation der Ziel-DNA (Target-DNA) erfolgt in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700 von Perkin Elmer) mit vorzugsweise beheiztem Deckel. Hierbei wird die DNA zuerst für 5 min bei 94°C denaturiert und anschließend für 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

30 sec	94°C	Zyklus-Denaturierung
15 sec	56°C	Primer-Hybridisierung („Annealing,,)
20 sec	72°C	Elongation („Extension,,)

Zum Abschluß des PCR-Programmes erfolgt eine nochmalige Elongation bei 72°C für 1min.

Die Auswahl der Starteroligonucleotide (Primer) bestimmt letztendlich die Taxonspezifität der PCR-Amplifikation und ermöglicht somit die Identifizierung der in der Probe vorhandenen Bakterien. Hierbei kann der Primer A sowohl zur taxonspezifischen Hybridisierung an einen variablen Bereich der Ziel-DNA, als auch zur breitbandspezifischen Hybridisierung an einen in allen Bakterien homologen Sequenzbereich dienen. Hingegen hybridisiert Primer B an einen artspezifischen Sequenzbereich der Bakterien-DNA und ist somit der entscheidende Faktor zur Bestimmung der Spezies/Gattung oder Gruppe. Für jeden

nachzuweisenden Organismus werden die jeweils benötigten Starteroligonucleotide A und B benötigt.

Beispiel 2: Milch

Bei den zum Nachweis in Milch relevanten Bakterien handelt es sich in erster Linie um folgende Gattungen/Spezies:

E. coli

Campylobacter spezies

Listeria spezies

Salmonella spezies

Zur Identifizierung der oben genannten Bakterien werden die nachfolgend aufgeführten DNA-Starteroligonucleotide herangezogen:

Gattung/Spezies	Starteroligonucleotid A	Starteroligonucleotid B
E.coli	10-30f (Seq. ID. Nr. 62)	Es.co3r (ID-Nr. 32)
Campylobacter spezies	10-30f	Ca.je1r (ID-Nr. 20)
Listeria spezies	10-30f	Li.mo2r (ID-Nr. 41)
Salmonella spezies	10-30f	Sa.xx5r (ID-Nr. 53)

Beispiel 3: Wasser

Bei den zum Nachweis in Wasser relevanten Bakterien handelt es sich in erster Linie um folgende Gattungen/Spezies:

E.coli

Enterobacter aerogenes

Klebsiella oxytoca

Pseudomonas aeruginosa

Enterobakterien⁶⁾

Zur Identifizierung der oben genannten Bakterien werden die nachfolgend aufgeführten DNA-Starteroligonucleotide herangezogen:

Gattung/Spezies	Starteroligonucleotid A	Starteroligonucleotid B
<i>E.coli</i>	10-30f	Es.co3r (ID-Nr. 32)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10-30f	En.ae2r (ID-Nr. 29)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	10-30f	Kl.ox3r (ID-Nr. 38)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10-30f	Ps.ae1r (ID-Nr. 49)
Enterobakterien ⁶⁾	10-30f	Gamma1r (ID-Nr.36)

⁶⁾ *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*/S.spp., *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella Typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica*

Beispiel 4: Für unterschiedliche in der Praxis vorkommende Proben wurden artifizielle Gemische im Experiment untersucht (Tabelle 2)

Häufige Fragestellungen in der Praxis erfordern vielfach eine Identifizierung von ganz bestimmten Keimen oder eines reduzierten Artenspektrums. Dies liegt in den ganz unterschiedlichen Wachstumsanforderungen der Bakterien begründet, das heißt, daß nicht alle Bakterienarten gleichsam in unterschiedlichen Proben wachsen oder leben können. Hieraus ergibt sich für Untersuchungen an Proben häufig die Bestimmung ganz bestimmter Bakterienarten, -gattungen, oder -gruppen (Beispiele 2 und 3). In Tabelle 1 sind Identifizierungen von Organismen dargestellt, die in ganz unterschiedlichen artifiziellen Gemischen hinsichtlich dieser Prämisse geprüft und einwandfrei bestimmt werden konnten.

Zur Identifizierung werden die Amplifikate der PCR-Reaktion auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und bei 5 - 6 V/cm Elektrodenabstand im elektrischen Feld durch Horizontalgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wird das Agarosegel für 10min in einer 0,5 µg/ml Ethidiumbromid/TAE-Puffer-Lösung gefärbt und unter einem UV-Transilluminator bei 254 nm photodokumentiert.

Die entwickelten Starteroligonucleotide weisen die genannten Bakterien auch in Mischproben hochspezifisch nach. Sofern eine Probe eine oder mehrere der gesuchten Bakterien enthält, wird dies durch eine Bande mit definierter Größe auf dem Elektrophoresegel sichtbar.

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von in Tabelle 1 angegebenen Mikroorganismen verschiedener Taxa in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen dieser Taxa enthalten kann, mittels Nucleinsäurehybridisierungstechniken bei Verwendung von Oligonucleotiden mit der Seq. ID. No 1 bis 62 als Sonden, unter Erhalt eines Hybridisierungsergebnisses, wobei für jeden nachzuweisenden Mikroorganismus mindestens ein Hybridisierungsergebnis erhalten wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei mittels einer Kreuzreaktion durch Zugabe mindestens einer zweiten von der ersten Sonde verschiedenen Hybridisierungssonde, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Oligonucleotide mit den Seq. ID No 1 bis 62 nach Maßgabe der in Tabelle 1 erfolgten Zuordnung, eine eindeutige Identifizierung des nachzuweisenden Mikroorganismus oder Gruppe von Mikroorganismen erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei eine Detektion der Kreuzreaktion räumlich und/oder zeitlich aufgelöst erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion durch Verwendung unterschiedlicher Markierungen der Hybridisierungssonden erfolgt.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungsergebnisse auf einem Substrat angeordnet sind.

- 18 -

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die auf dem Substrat angeordneten Hybridisierungsergebnisse ein für die nachzuweisenden Mikroorganismen charakteristisches Muster ergeben.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Hybridisierungsergebnis in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das zeitlich aufgenommene Hybridisierungsmuster spezifisch für die nachzuweisenden Mikroorganismen oder ein Ensemble von Mikroorganismen ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Hybridisierungsmuster durch Aufnahme von Hybridisierungsergebnissen erstellt wird, die durch Sonden mit unterschiedlicher Markierung erstellt werden.
10. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat ein DNA-Chip ist.
11. Substrat mit mindestens einer Art von Oligonucleotiden gemäß Seq. ID. No 1 - 61.
12. Substrat nach Anspruch 11, wobei das Substrat als DNA-Chip ausgebildet ist.

- 19 -

13. Kit enthaltend mindestens ein Oligonucleotid mit der Seq. Id. No 1 - 62, ggf. auf mindestens einem Substrat nach einem der Ansprüche 11 oder 12 sowie Hilfsmittel zu Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
14. Oligonucleotide mit den in Seq. Id. Nr. 1 - 61 wiedergegebenen Sequenzen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BNSDOCID: <WO 9922023A3 | >

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

International application No.
PCT/ EP 98/06863

IPC6. C12Q 1/68

B. FIELDS SEARCHED

IPC6. C12Q

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV; JANNES GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEUVERSWYN H) 4 January 1996 (04.01.96) cited in the application	1,5,6
Y	see page 41, line 30 - page 42, line 16; claims 33, 34, see page 95, see page 71, see page 1, line 1 - page 3, line 23, see page 53, line 16 - page 54, line 4; examples 2, 9, see page 91, columns 9-22	10
X	--- WAGNER M ET AL; "Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus Acinetobacter and its application for in situ monitoring in activated sludge." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, (1994 MAR) 60 (3) 792-800., XP002096198 see the whole document ---	1,5,6

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

X	See patent family annex.
---	--------------------------

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
2 July 1999 (02.07.99)

Date of mailing of the international search report
19 July 1999 (19.07.99)

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office
Facsimile No.

Authorized officer _____
Telephone No. _____

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP 98/06863**C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Database Empatent, Entry E04712, Account No. E04712, 8 October 1997 (08.10.97), "Probe DNA for drug sensitivity analysis" XP002108049 see abstract & JP 1993 000 100 A (NIPPON FLOUR MILLS CO LTD) 8 January 1993 (08.01.93) --	1-4
A	WO 93 04199 A (SCIENT GENERICS LTD) 4 March 1993 (04.03.93) see example 4 --	1-4
A	EP 0 318 245 A (ML TECHNOLOGY VENTURES) 31 May 1989 (31.05.89), see example 1 --	1-4
P,X	WO 97 41253 A (MIRA DIAGNOSTICA GMBH; LEISER ROBERT MATTHIAS (DE); SPERVESLAGE JE) 6 November 1997 (06.11.97) cited in the application, see the whole documet -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ EP 98/06863

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IBRAHIM A ET AL: "Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus Acinetobacter as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis." INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, (1997 Jul) 47 (3) 837-41., XP002096199	13
Y	see page 840, line 53 - page 841 line 31; figure 3 see page 837 - page 839, line 5	1,5,6 11,14
Y	-- GUSCHIN D Y ET AL: "OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIPS AS GENOSENSORS FOR DETERMINATIVE AND ENVIRONMENTAL STUDIES IN MICROBIOLOGY" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, volume 63, No. 6, June 1997, pages 2397-2402, XP002064989	10
A	see the whole document	1-3,5,6,11,12
X	-- WO 95 24574 A (MICROPROBE CORP; BRITISCHGI THERESA B (US); CANGELOSI GERARD A (US) 21 December 1995 (21.12.95) see page 42; table 5	1-4
Y	-- RAINEY F A ET AL: "The phylogenetic structure of the genus Acinetobacter" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, (15 December 1994) 124 (3) 349-52., XP002096200, see the whole document	1,5,6,11, 13,14
Y	-- ENRIGHT M C ET AL: "PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN SOME MEMBERS OF THE GENERA NEISSERIA, ACINETOBACTER, MORAXELLA, AND KINGELLA BASED ON PARTIAL 16S RIBOSOMAL DNA SEQUENCE ANALYSIS" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, volume 44, No. 3, July 1994, pages 386-391, XP000605280, see abstract; table 1	1,5,6,11, 13,14
Y	-- US 5 541 308 A (HOGAN JAMES J ET AL) 30 July 1996 see abstract, see column 1- column 2, line 6, see column 5, line 43 - column 8, line 6	1,5,6 11,13,14
A	-- EHRMANN M ET AL: "REVERSE DOT BLOT HYBRIDIZATION: A USEFUL METHOD FOR THE DIRECT IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN FERMENTED FOOD" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1994, pages 143-149, XP000612834, see abstract, figure 1; table 2	1-3,5,6, 11
A	-- BRAUN-HOWLAND E B ET AL: "USE OF A SIMPLIFIED CELL BLOT TECHNIQUE AND 16S RRNA-DIRECTED PROBES FOR IDENTIFICATION OF COMMON ENVIRONMENTAL ISOLATES" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, volume 59, No. 10, October 1993, pages 3219-3224, XP000604178 see the whole document	1-3,5, 13,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06863

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-14

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☒
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 1), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.
2. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 2), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.
3. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 3), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.
4. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 4), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.
5. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 5), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.
6. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 6), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.
7. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 7), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.
8. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 8), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.
9. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 9), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.
10. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 10), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.
11. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 11), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

12. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 12), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

13. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 13), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

14. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 14), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

15. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 15), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

16. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 16), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

17. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 17), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

18. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 18), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

19. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 19), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

20. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 20), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

21. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 21), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

22. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 22), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

23. Claims Nos. 1,5-14 (in part)
Oligonucleotide (Seq. ID. No. 23), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

24. . Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 24), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

25. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 25), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

26. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 26), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

27. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 27), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

28. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 28), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

29. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 29), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

30. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 30), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

31. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 31), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

32. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 32), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

33. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 33), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

34. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 34), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

35. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 35), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

36. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 36), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

37. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 37), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

38. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 38), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

39. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 39), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

40. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 40), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

41. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 41), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

42. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 42), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

43. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 43), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

44. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 44), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

45. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 45), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

46. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 46), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

47. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 47), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

48. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 48), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

49. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 49), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

50. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 50), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

51. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 51), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

52. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 52), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

53. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 53), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

54. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 54), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

55. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 55), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

56. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 56), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

57. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 57), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

58. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 58), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

59. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 59), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

60. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 60), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

61. Claims Nos. 1,5-14 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 61), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

62. Claims Nos. 1,5-10, 13 (in part)

Oligonucleotide (Seq. ID. No. 62), identification methods which use this oligonucleotide and substrates and kits which contain this oligonucleotide.

63. Claims Nos. 2-4 (in full); 1, 5-13 (in part)

Specific and cross-reactive, non specific 16S RNA probe combinations, as cited in table 1, identification methods using these probe combinations and substrates and kits containing these probe combinations.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06863

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9600298	A	04-01-1996	AU 2924695 A BR 9508101 A CA 2193101 A CZ 9603819 A EP 0769068 A JP 10501976 T	19-01-1996 30-12-1997 04-01-1996 15-04-1998 23-04-1997 24-02-1998
WO 9534574	A	21-12-1995	AU 2865495 A EP 0804455 A US 5712095 A US 5770373 A US 5726021 A	05-01-1996 05-11-1997 27-01-1998 23-06-1998 10-03-1998
US 5541308	A	30-07-1996	US 5683876 A US 5677127 A US 5677128 A US 5677129 A US 5827651 A US 5693468 A US 5691149 A US 5693469 A US 5679520 A US 5714321 A US 5674684 A US 5840488 A US 5595874 A US 5547842 A US 5593841 A AT 163680 T AU 616646 B AU 1041988 A CA 1339871 A DE 3752172 D DE 3752172 T DK 413788 A EP 0272009 A ES 2112824 T FI 883482 A JP 10042880 A JP 1503356 T KR 9511719 B PT 86204 A,B WO 8803957 A	04-11-1997 14-10-1997 14-10-1997 14-10-1997 27-10-1998 02-12-1997 25-11-1997 02-12-1997 21-10-1997 03-02-1998 07-10-1997 24-11-1998 21-01-1997 20-08-1996 14-01-1997 15-03-1998 07-11-1991 16-06-1988 19-05-1998 09-04-1998 02-07-1998 23-09-1988 22-06-1988 16-04-1998 22-07-1988 17-02-1998 16-11-1989 09-10-1995 01-12-1987 02-06-1988
WO 9304199	A	04-03-1993	NONE	
EP 0318245	A	31-05-1989	US 5030557 A AT 106947 T AU 2611288 A CA 1319336 A DE 3850055 D DE 3850055 T DK 361289 A ES 2056115 T FI 893526 A JP 2502250 T JP 2820749 B KR 9615893 B	09-07-1991 15-06-1994 14-06-1989 22-06-1993 14-07-1994 29-09-1994 20-09-1989 01-10-1994 21-07-1989 26-07-1990 05-11-1998 23-11-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/06863

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0318245 A		PT 89050 A,B WO 8904876 A	01-12-1988 01-06-1989
WO 9741253 A	06-11-1997	DE 19616750 A AU 2888497 A	06-11-1997 19-11-1997

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 00298 A (INNOGENETICS NV ; JANNES GEERT (BE); ROSSAU RUDI (BE); HEUVERSWYN H) 4. Januar 1996	1,5,6
Y	in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 41, Zeile 30 - Seite 42, Zeile 16; Ansprüche 33,34 siehe Seite 95 siehe Seite 71 siehe Seite 1, Zeile 1 - Seite 3, Zeile 23 siehe Seite 53, Zeile 16 - Seite 54, Zeile 4; Beispiele 2,9 siehe Seite 91, Spalte 9-22 --- -/--	10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Juli 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19.07.99

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WAGNER M ET AL: "Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus Acinetobacter and its application for in situ monitoring in activated sludge." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, (1994 MAR) 60 (3) 792-800., XP002096198 siehe das ganze Dokument ----	1,5,6
X	IBRAHIM A ET AL: "Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus Acinetobacter as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis." INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, (1997 JUL) 47 (3) 837-41., XP002096199 ----	13
Y	siehe Seite 840, Zeile 53 - Seite 841, Zeile 31; Abbildung 3 siehe Seite 837 - Seite 839, Zeile 5 ----	1,5,6, 11,14
Y	GUSCHIN D Y ET AL: "OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIPS AS GENOSENSORS FOR DETERMINATIVE AND ENVIRONMENTAL STUDIES IN MICROBIOLOGY" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 63, Nr. 6, Juni 1997, Seiten 2397-2402, XP002064989 siehe das ganze Dokument ----	10
A	WO 95 34574 A (MICROPROBE CORP ;BRITISCHGI THERESA B (US); CANGELOSI GERARD A (US) 21. Dezember 1995 siehe Seite 42; Tabelle 5 ----	1-3,5,6, 11,12
X	WO 95 34574 A (MICROPROBE CORP ;BRITISCHGI THERESA B (US); CANGELOSI GERARD A (US) 21. Dezember 1995 siehe Seite 42; Tabelle 5 ----	1-4
Y	RAINEY F A ET AL: "The phylogenetic structure of the genus Acinetobacter" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, (1994 DEC 15) 124 (3) 349-53., XP002096200 siehe das ganze Dokument ----	1,5,6, 11,13,14
Y	ENRIGHT M C ET AL: "PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN SOME MEMBERS OF THE GENERA NEISSERIA, ACINETOBACTER, MORAXELLA, AND KINGELLA BASED ON PARTIAL 16S RIBOSOMAL DNA SEQUENCE ANALYSIS" INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, Bd. 44, Nr. 3, Juli 1994, Seiten 387-391, XP000605280 siehe Zusammenfassung; Tabelle 1 ----- -/--	1,5,6, 11,13,14

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 541 308 A (HOGAN JAMES J ET AL) 30. Juli 1996 siehe Zusammenfassung siehe Spalte 1 - Spalte 2, Zeile 6 siehe Spalte 5, Zeile 43 - Spalte 8, Zeile 6 ---	1,5,6, 11,13,14
A	EHRMANN M ET AL: "REVERSE DOT BLOT HYBRIDIZATION: A USEFUL METHOD FOR THE DIRECT IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN FERMENTED FOOD" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1994, Seiten 143-149, XP000612834 siehe Zusammenfassung; Abbildung 1; Tabelle 2 ---	1-3,5,6, 11
A	BRAUN-HOWLAND E B ET AL: "USE OF A SIMPLIFIED CELL BLOT TECHNIQUE AND 16S RRNA-DIRECTED PROBES FOR IDENTIFICATION OF COMMON ENVIRONMENTAL ISOLATES" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 59, Nr. 10, Oktober 1993, Seiten 3219-3224, XP000604178 siehe das ganze Dokument ---	1-3,5, 13,14
A	Database Empatent Entry E04712 Acc. Nr. E04712, 08-10-1997 "Probe DNA for drug sensitivity analysis" XP002108049 siehe Zusammenfassung & JP 1993 000 100 A (NIPPON FLOUR MILLS CO LTD) 8. Januar 1993 ---	1-4
A	WO 93 04199 A (SCIENT GENERICS LTD) 4. März 1993 siehe Beispiel 4 ---	1-4
A	EP 0 318 245 A (ML TECHNOLOGY VENTURES) 31. Mai 1989 siehe Beispiel 1 ---	1-4
P,X	WO 97 41253 A (MIRA DIAGNOSTICA GMBH ;LEISER ROBERT MATTHIAS (DE); SPERVESLAGE JE) 6. November 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-13

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☒ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
1-14
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☒ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 1), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

2. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 2), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

3. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 3), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

4. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 4), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

5. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 5), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

6. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 6), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

7. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 7), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

8. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 8), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

9. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 9), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

10. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 10), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

11. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 11), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

12. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 12), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

13. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 13), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

14. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 14), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

15. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 15), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

16. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 16), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

17. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 17), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

18. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 18), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

19. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 19), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

20. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 20), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

21. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 21), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

22. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 22), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

23. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 23), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

24. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 24), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

25. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 25), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

26. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 26), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

27. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 27), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

28. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 28), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

29. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 29), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

30. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 30), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

31. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 31), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

32. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 32), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

33. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 33), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

34. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 34), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

35. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 35), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

36. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 36), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

37. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 37), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

38. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 38), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

39. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 39), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

40. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 40), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

41. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 41), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

42. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 42), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

43. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 43), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

44. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 44), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

45. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 45), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

46. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 46), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

47. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 47), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

dieses Oligonukleotid beinhalten.

48. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 48), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

49. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 49), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

50. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 50), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

51. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 51), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

52. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 52), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

53. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 53), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

54. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 54), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

55. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 55), Nachweisverfahren die

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

56. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 56), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

57. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 57), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

58. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 58), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

59. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 59), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

60. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 60), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

61. Ansprüche: 1, 5-14 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr. 61), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

62. Ansprüche: 1, 5-10, 13 (teilweise)

Oligonukleotid (SEQ.ID. Nr.62), Nachweisverfahren die dieses Oligonukleotid benutzen und Substrate und Kits die dieses Oligonukleotid beinhalten.

63. Ansprüche: 2-4 (komplett), 1,5-13 (teilweise)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

In Tabelle 1 angegebene Kombinationen von spezifischen mit kreuzreaktiven, unspezifischen 16S-RNA Sonden, Nachweisverfahren die diese Sondenkombinationen benutzen und Substrate und Kits die diese Sondenkombinationen beinhalten.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06863

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9600298	A	04-01-1996	AU	2924695 A	19-01-1996
			BR	9508101 A	30-12-1997
			CA	2193101 A	04-01-1996
			CZ	9603819 A	15-04-1998
			EP	0769068 A	23-04-1997
			JP	10501976 T	24-02-1998
WO 9534574	A	21-12-1995	AU	2865495 A	05-01-1996
			EP	0804455 A	05-11-1997
			US	5712095 A	27-01-1998
			US	5770373 A	23-06-1998
			US	5726021 A	10-03-1998
US 5541308	A	30-07-1996	US	5683876 A	04-11-1997
			US	5677127 A	14-10-1997
			US	5677128 A	14-10-1997
			US	5677129 A	14-10-1997
			US	5827651 A	27-10-1998
			US	5693468 A	02-12-1997
			US	5691149 A	25-11-1997
			US	5693469 A	02-12-1997
			US	5679520 A	21-10-1997
			US	5714321 A	03-02-1998
			US	5674684 A	07-10-1997
			US	5840488 A	24-11-1998
			US	5595874 A	21-01-1997
			US	5547842 A	20-08-1996
			US	5593841 A	14-01-1997
			AT	163680 T	15-03-1998
			AU	616646 B	07-11-1991
			AU	1041988 A	16-06-1988
			CA	1339871 A	19-05-1998
			DE	3752172 D	09-04-1998
			DE	3752172 T	02-07-1998
			DK	413788 A	23-09-1988
			EP	0272009 A	22-06-1988
			ES	2112824 T	16-04-1998
			FI	883482 A	22-07-1988
			JP	10042880 A	17-02-1998
			JP	1503356 T	16-11-1989
			KR	9511719 B	09-10-1995
			PT	86204 A,B	01-12-1987
			WO	8803957 A	02-06-1988
WO 9304199	A	04-03-1993			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06863

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0318245 A	31-05-1989	US 5030557 A	09-07-1991
		AT 106947 T	15-06-1994
		AU 2611288 A	14-06-1989
		CA 1319336 A	22-06-1993
		DE 3850055 D	14-07-1994
		DE 3850055 T	29-09-1994
		DK 361289 A	20-09-1989
		ES 2056115 T	01-10-1994
		FI 893526 A	21-07-1989
		JP 2502250 T	26-07-1990
		JP 2820749 B	05-11-1998
		KR 9615893 B	23-11-1996
EP 0318245 A		PT 89050 A,B	01-12-1988
		WO 8904876 A	01-06-1989
WO 9741253 A	06-11-1997	DE 19616750 A	06-11-1997
		AU 2888497 A	19-11-1997

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)